

日本再生医療学会総会、2010年3月、広島。

4. 五香麻衣子、佐藤千香子、過足芳子、松山さと子、高橋和利、山中伸弥、近藤 靖、中村直子、佐伯久美子、湯尾 明：ヒトES/iPS細胞由来血管内皮細胞における継代培養に伴う老化誘発の機序解析。第9回日本再生医療学会総会、2010年3月、広島。
5. 千葉 滋：Notchシグナルによる造血幹細胞の未分化性維持と分化誘導-多様性と分子基盤。第9回日本再生医療学会総会、2010年3月、広島。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ヒト脂肪由来幹細胞を用いた医薬品開発研究

所 属 国立成育医療センター研究所
研究者 田上 昭人
研究期間 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

研究要旨 美容形成目的に脂肪吸引されたヒト脂肪組織より、脂肪由来幹細胞(間葉系細胞)の分離・樹立を行った。樹立したヒト脂肪由来幹細胞は、保存・バンキングを行い、さらに薬物毒性試験に応用を図った。脂肪由来幹細胞から種々の細胞(神経細胞や脂肪細胞等)への分化誘導法の確立を行い、その分化増殖過程における薬物の影響を分子生物学的・組織学的手法を用いて解析を行った。

分担研究者

- (1) 京都大学再生医科学研究所 田畑泰彦
- (2) 株式会社バイオマスター 村瀬祥子
- (3) 株式会社アーティセルシステムズ 中山洋一
- (4) 国立成育医療センター研究所 廣山眞巳

A. 研究目的

これまで薬物毒性・薬物代謝の評価試験には、種々の細胞や動物が用いられてきたが、種差の問題等が残されヒト組織を用いた試験法の開発が必要とされている。手術などで得られるヒト組織(主に肝臓、腎臓)を用いた薬物評価も試みられているが、充分量の検体を得ることは非常に困難であり、組織の均一性などの問題も残され、新たな試験法の開発が必要とされている。この問題点を解決する方法の一つとして、ヒト組織由来幹細胞の利用が注目されている。これまでに、血球系幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞など種々の組織に由来する幹細胞が同定されているが、最近、ヒト皮下脂肪組織のなかにも間葉系幹細胞

(脂肪幹細胞)が存在することが報告され、より簡便な細胞治療の供給源として期待されている。ヒトの皮下脂肪は体重の10%以上を占める人体最大の組織である。美容形成目的に脂肪吸引された皮下脂肪より分離される脂肪由来幹細胞は、細胞治療の供給源としてのみならず、ヒト組織・細胞を用いた毒性評価にも応用することが可能である。脂肪由来幹細胞は間葉系の多能性を有するだけでなく、CD34陽性で血管新生などの治療にも有効性が示唆されており、採取も簡単で細胞培養による増殖能も高いことから最近注目されている。脂肪由来幹細胞の特徴は、間質細胞でありながらCD34陽性細胞が非常に多いこと、培養すればCD105(間葉系の多分化能に関連)陽性であること、さらに特殊培養技術によって血管前駆細胞に特徴であるFlk-1陽性細胞、CD117(c-kit)陽性細胞を大量に得ることができることなど、他の組織幹細胞にはないユニークな面を持っていることが知られている。このような背景のもと、ヒト皮下脂肪組織から得られた脂肪由来幹細胞を用いて骨格筋細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨・軟骨細胞など

に分化誘導を行うことにより、安定して均一なヒト細胞が入手することが可能となる。この脂肪由来幹細胞および脂肪由来幹細胞から分化させた細胞を用いて薬物毒性試験方法の開発を行い、薬物の評価を行う。

B. 研究方法

1) 患者皮下脂肪より脂肪組織の吸引手術・吸引された脂肪組織の保存・脂肪由来幹細胞(間葉系幹細胞)の分離・保存・バンキング
湘南美容外科クリニックにおいて吸引された脂肪組織から脂肪由来幹細胞を分離し解析に用いる。

(1) 脂肪由来幹細胞の分離

ヒト吸引脂肪を遠心し脂肪部分と廃液部分に分け、脂肪部分はコラゲナーゼ処理を行なった。フィコール処理または溶血処理により赤血球を除去し脂肪由来幹細胞を含む細胞群を分離した。

(2) 細胞培養

PLA 細胞と LAF 細胞の増殖培養用培地は M199(10%FBS)を用いた。

(3) 分化誘導

分離した PLA 細胞と LAF 細胞を 1 週間培養し、その後分化誘導培地に置換して分化誘導を行なった。脂肪への分化誘導は、分化培地で 4 週間培養後にオイルレッド O 染色で確認した。骨への誘導も同様に実施し、von Kossa 染色を行なった。軟骨への誘導は 3 週間マイクロマス培養を行い軟骨様細胞塊の形成で確認した。

(4) 表面抗原解析

分離した脂肪由来幹細胞を、各標識抗体(BD

Bioscience) と 30 分間反応させ、1%パラホルムアルデヒド固定後にフローサイトメーターで解析した。装置は FACS Vantage(BD)を用いた。

(5) 凍結保存

脂肪由来幹細胞はセルバンカー(日本全薬工業)に懸濁し -80°C で凍結保存した。

2) 脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の確立

(1) 培養方法の開発

ヒト脂肪組織をはさみで細片化、コラゲナーゼ消化により、細胞を遊離させた。この細胞を 10%仔牛血清を含む MEM 培地(通常培地)中で培養、接着細胞をヒト脂肪由来幹細胞として用いた。継代数 2 回目の細胞を以下の細胞接着、増殖、分化などの実験に供した。用いた基材は、ガラスおよび表面の水漏れ性(水に対する接触角)の異なる種々なプラスチック、市販の細胞培養シャーレ、およびその表面にコラーゲン(type I)、フィブロネクチン、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)をコーティングした培養シャーレなどである。これらの異なる培養基材上にヒト脂肪由来幹細胞を播種、6 時間後の接着細胞数、および 1, 3, 7 日後の増殖挙動を調べた。次に、脂肪由来幹細胞を骨分化および脂肪分化培地中で培養し、それぞれの細胞への分化を検討した。骨分化は、分化特異マーカーであるアルカリホスホターゼ活性(ALP)とカルシウム沈着から、脂肪分化は分化マーカーである Glyceral-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性と細胞内での脂肪滴蓄積の程度から評価した。また、基材表面の電荷的および親水-疎水性質を変化させるために、アルカンチオ

ールからなる自己凝集型単分子膜 (self assembled monolayer, SAM) 技術を利用した。チオール基を片末端に、もう片末端にカルボキシル基 (負電荷)、アミノ基 (正電荷)、水酸基 (非電荷親水性)、あるいはメチル基 (疎水性) をもつアルカンチオールを用いた。まず、ポリエチレンテレフタレート (PET) フィルム表面に金薄膜を蒸着した。これらの金蒸着 PET フィルムを異なるアルカンチオールを含むエタノール中に所定時間浸漬することで、PET 表面に種々の化学官能基を導入した。また、2 種類のアルカンチオールを異なる濃度比で反応させることで、2 種類の化学官能基が異なる比率で混合した基材表面を作ることを行った (混合 SAM 技術)。SAM 技術により基材表面に導入したカルボキシル基を利用して、細胞培着ペプチド (RGDS) を固定化した。カルボキシル基を水溶性カルボジイミドで活性化した後、異なる濃度の RGDS を添加、カルボキシル基と RGDS を化学結合した。RGDS の表面導入率は、放射標識した RGDS を化学結合させた後、その放射活性を測定することによって求めた。これらの表面化学組成の異なる基材上でヒト由来幹細胞を培養し、それらの性質が細胞の接着、増殖、分化におよぼす効果について検討した。なお、基材表面のキャラクタリゼーションは表面接触角および Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA) による分析により行った。

3) 脂肪細胞への分化

(1) 脂肪幹細胞の分化実験

美容形成外科目的に皮下脂肪吸引されたヒト脂肪組織から、脂肪由来幹細胞 (間葉系幹細胞)

の分離・樹立は、株式会社バイオマスターによって確立された。この脂肪由来幹細胞 (脂肪幹細胞) は、各々の分化誘導を行うと肝細胞や神経細胞などの細胞に分化させることができる多分化能を有し、自発的に脂肪細胞に分化しない細胞である。

(2) 褐色脂肪細胞分化条件の検討

褐色脂肪細胞の分化条件を以下のように検討した。

条件①: 脂肪幹細胞に、DMEM 培地に 1 mM デキサメサゾン (Dex)、0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX)、10 mg/ml インスリンを加えた白色脂肪分化誘導培地で 2 日間培養し、30 mM 9-cis retinoic acid をさらに加えた培地で 2 日間培養する。その後 5 mg/ml インスリンのみ加えた分化促進培地で 4-7 日間培養する。

条件②: 脂肪幹細胞に、DMEM 培地に 1 mM デキサメサゾン (Dex)、0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX)、30 mM 9-cis retinoic acid、10 mg/ml インスリンを加えた白色脂肪分化誘導培地で 2 日間培養し、その後 5 mg/ml インスリンのみ加えた分化促進培地で 4-7 日間培養する。

いずれの条件においても最終的に、RT-PCR 法で褐色脂肪細胞のマーカーである UCP1 の発現を確認することによって、褐色脂肪細胞への分化効率を評価した。

(3) 脂肪幹細胞/脂肪細胞の機能解析

マウス脂肪前駆細胞 (3T3-L1 細胞) は、DS ファーマバイオメディカル株式会社より購入した。創傷治癒測定 (Wound healing assay) コンフルエントな状態の単層培養細胞にピペット用の

チップの先端で引っ掻き傷をつけ、傷をつけた直後(0時間)および10時間後の細胞の様子を顕微鏡で観察した。各々の画像を取得した後、経過時間で観察した細胞の移動距離を測定し、未処理のコントロール群と薬剤添加したサンプル群とを比較検討した。

共免疫沈降法:HEK293細胞にタグの付加した目的蛋白質が発現するプラスミドをリン酸カルシウム法およびエレクトロポレーション法にて遺伝子導入した後、細胞抽出溶液に各々特異性のある抗体とプロテインGセファロースと混ぜ反応させた。その後、SDS-PAGE、ウェスタンブロットで検出した。

(4) 脂肪細胞への分化誘導及び脂肪由来幹細胞及び幹細胞から分化する細胞における培養系を用いた薬物毒性評価系の確立・薬物の評価

脂肪由来幹細胞(脂肪幹細胞)は、各々の分化誘導を行うと肝細胞や神経細胞などの細胞に分化させることができる多分化能を有している。この細胞に、DMEM培地に1mM デキサメサゾン (Dex)、0.5mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX)、10mg/ml インスリンを加えた分化誘導培地で2日間培養し、その後5mg/ml インスリンのみ加えた分化促進培地で4-7日間培養する。分化を誘導してから4日目頃から脂肪滴を含んだ脂肪細胞が現れ、次第のその数を増やしていく。最終的に、Oil Red 染色法で脂肪滴を染め、陽性細胞の数によって分化効率を評価した。一方、褐色脂肪細胞への分化条件は、白色脂肪細胞の分化培地にさらに30mM レチノイン酸を添加した培地を用い、同条件下で

培養した。

(倫理面への配慮)

本研究実施において、対象患者個人人のプライバシーをはじめと人権擁護を最優先とし、危険性の排除や説明と理解(インフォームドコンセント)を徹底する。

採取された脂肪組織を本研究に用いることは、湘南美容外科クリニック、株式会社バイオマスター並びに国立成育医療センターの倫理審査委員会にて承認が得られている(国立成育医療センター倫理審査委員会:平成18年7月31日承認、株式会社バイオマスター倫理審査委員会:平成18年5月9日承認)。湘南美容外科クリニックにおいて主治医からインフォームドコンセントを受け同意を得た後に提供された脂肪組織を用いる。提供して頂く組織は、美容形成目的に皮下脂肪吸引を行った方から提供されるものであり、通常は医療廃棄物として廃棄される組織である。脂肪組織は湘南美容外科クリニックにて匿名化された後に株式会社バイオマスターへ運搬され、脂肪由来幹細胞(間葉系幹細胞)分離の処理を行う。株式会社バイオマスターと国立成育医療センターにおいては、連結不可能匿名化され管理番号のみ附された検体を受け入れる。本研究は、平成10年厚生科学審議会答申が定める「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」に従い研究を遂行する。

レンチウイルスの使用にあたっては、遺伝子組み換え実験の規制に関する関連法を遵守する。

C. 研究成果

1) 患者皮下脂肪より脂肪組織の吸引手術・吸引された脂肪組織の保存・脂肪由来幹細胞（間葉系幹細胞）の分離・保存・バンキング

ヒト吸引脂肪は脂肪部分と廃液部分に分けることができる（図1）。これまでは脂肪部分からのみ接着細胞が分離されていたが、廃液部分からも細胞が分離された。脂肪部分から分離される細胞（PLA細胞）と廃液部分から分離される細胞（LAF細胞）をM199(10%FBS)で培養すると、共に高い増殖能を示した。



図1：ヒト吸引脂肪

PLA細胞とLAF細胞は形態的に非常に似ており、また共に強い増殖能と多分化能を持つことが分かった。吸引脂肪から分離される細胞には血液由来の細胞や血管由来の細胞が混在しているが、その中で脂肪由来幹細胞はCD34を発現している。さらにCD34陽性細胞はCD45陽性と陰性に2分され、CD34+/CD45

ー細胞のみが接着増殖することが分かった。このCD34+/CD45ー細胞を脂肪由来幹細胞と仮定し、脂肪部分と廃液部分から分離される細胞数を比較した（図2）。それぞれから分離される有核細胞数はPLAがLAFよりも2~8倍多いが、含まれる脂肪由来幹細胞の比率は有意差が無いことが明らかになった。また接着培養7日後の脂肪由来幹細胞数の割合は、両者が同等または個人によってはLAFの方が上回る結果となった。これは廃液中に多く含まれる血液由来細胞が培養中に除去されるためと考えられる。

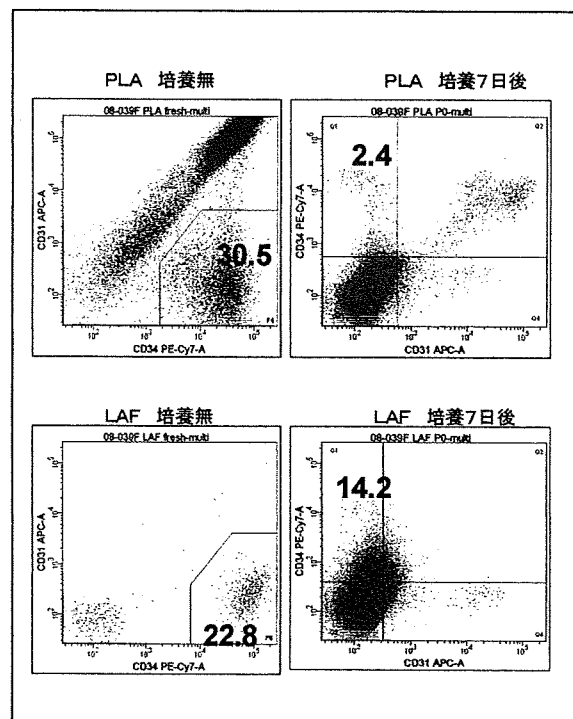


図2：PLAとLAFに含まれる脂肪由来幹細胞の比率

ヒト組織由来の細胞は、増殖や分化などに

個人差があることが想定される。これまでの報告で、一般的な細胞の特徴に対して詳細に解析された例は無いが、薬剤耐性などについてはいくつかの報告がある。本研究で解析した細胞においても、分離直後の細胞増殖や分化誘導効率は、必ずしも一定ではなかった。検体間の違いを解析し、標準的な細胞を選別するためには複数の細胞を確保することが必要であるためバンキングを行なった。16 検体の吸引脂肪組織から 17 種類の細胞を保存した (表)。

Sample ID	PLA/LAF	passage	本数
070927	PLA	0	12
	LAF	0	2
071017	LAF	0	4
071112	PLA	0	14
071115	PLA	0	20
071119	PLA	0	20
071120	PLA	0	20
071130	PLA	0	20
080221	PLA	0	3
080509	PLA	0	10
080527	PLA	0	1
080529	PLA	0	4
080704	PLA	0	2
080801	PLA	0	1
080806	PLA	0	1
081010	PLA	0	3
081021	PLA	0	4

表 凍結保存細胞一覧

2) 脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の確立
(骨・軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞、骨格筋細胞、内胚葉系細胞など) および細胞の分子生物学的特性の解析

(1) 培養方法の開発

¹²⁵I 標識したタンパク質を利用して、培養シャ

ーレ上へのタンパク質のコーティング後の吸着量を調べたところ、その吸着量から算出して、それぞれのタンパク質が基材上を十分にコーティングできていることを確認した。作製された PET フィルム表面の接触角と ESCA 測定結果から、アルカンチオール SAM 技術により、表面が予想通り、負電荷、正電荷、親水性、疎水性へと変化していることがわかった。また、仕込みアルカンチオール量と表面導入アルカンチオール量とはよい相関が見られ、SAM 技術により基材表面の改質が可能であることがわかった。

表面の接触角が 60-80° の基材上でのヒト脂肪由来幹細胞の接着と増殖が、それ以外の接触角をもつ基材に比べて、高くなっていた。

また、コラーゲン、フィブロネクチン 1bFGF 固定化により細胞の初期接着数と増殖数は増加した。骨分化について調べた結果、細胞の増殖が高まるとともに、ALP 活性とカルシウム沈着量は増加した。しかしながら、細胞の 1 つ当りの分化マーカーは、培養基材の種類によらず、ほぼ一定であった。これに対して、脂肪分化は、基材の種類に依存しなかった。

アルカンチオール SAM 技術により作製した電荷および親水疎水性の異なる表面をもつ基材上で、ヒト脂肪由来幹細胞を培養したところ、メチル基や水酸基に比較して、カルボキシル基およびアミノ基をもつ表面で細胞の増殖性が高まった。脂肪分化については、水酸基とカルボキシル基、および水酸基とメチル基との混合によって分化が促進されることがわかった。次に、表面に固定化された COOH 基を介して細胞接着活性をもつ RGDS を表面に化

学固定した。RGDS 固定化により、細胞の初期接着と増殖は高まった。アルカンチオールの置換反応を利用して、COOH 基濃度のグラジエントを利用して PET 表面に固定化 RGDS の濃度グラジエントを形成した。その結果、表面固定化 RGDS 濃度に対応した細胞の増殖が認められた。このように、基材表面の性質がヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖、分化挙動に影響を与えることがわかった。

(2) 誘導法の開発

脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の確立 125I 標識したタンパク質あるいは TNBS 法を利用して、培養基材表面へのタンパク質の固定化量を調べたところ、その吸着量から算出して、それぞれのタンパク質が基材上を十分均一にコーティングできていることを確認した。また、同様の定量方法により、NaOH 処理 PET 基材へのカルボジイミド結合法を利用することで、タンパク質や RGDS が基材表面に化学固定できたことも確認した。コーティングあるいは固定化処理を行っていない元の PET 基材に比べて、コラーゲン、フィブロネクチン、bFGF 固定化により細胞の初期接着数と増殖数は増加した。この傾向は、2次元と3次元のいずれの基材に対しても認められた。しかしながら、2次元 PET フィルムに比べて、3次元の PET 不織布の方が、細胞の増殖速度が大きくなっていることがわかった。これは増殖するための表面が3次元基材の方が広いためか、あるいは空間的な違いが影響しているのか、いろいろな理由が考えられる。骨分化について調べた結果、細胞の増殖が高まるとともに、ALP 活性とカルシウム沈着量は増加した。し

かしながら、細胞の1つ当りの分化マーカーは、培養基材の種類によらず、ほぼ一定であった。これに対して、脂肪分化は、基材の種類に依存しなかった。次に、表面に固定化された COOH 基を介して細胞接着活性をもつ RGDS を表面に化学固定した。2次元、3次元のいずれの基材に対しても、RGDS 固定化により、細胞の初期接着と増殖は高まった。タンパク質を固定化した基材においても、同じ傾向が見られた。また、コーティングあるいは化学結合などのタンパク質固定化法の違いは細胞の接着と増殖促進には影響を与えなかった。以上のように、2次元および3次元といった基材の立体構造と基材表面の性質がヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖、分化挙動に影響を与えることがわかった。

3) 脂肪細胞への分化誘導法の開発及び脂肪由来幹細胞及び幹細胞から分化する細胞における培養系を用いた薬物毒性評価系の確立・薬物の評価

(1) 褐色細胞分化の検討

2つの条件で褐色脂肪細胞に分化させた。条件①は、白色脂肪細胞分化誘導培地で2日間培養後に、9-cis retinoic acidを含さらに加えた培地で2日間培養する他の研究グループで分化を成功させている方法である。しかし、条件①では白色脂肪細胞分化誘導培地のみで培養する期間があるために、白色脂肪細胞への分化が進んでしまうことが考えられた。そこで条件②では、分化誘導開始から培地に9-cis retinoic acidを加えて分化誘導させた。分化後各々の細胞におけるUCP-1遺伝子の発現を確認した結果、条件②で分化させた細胞で、コントロール(未分化細

胞)、白色脂肪細胞、条件①で分化させた細胞より明らかな遺伝子発現の上昇が確認できた。また、Oil redによる脂肪滴を有する細胞数を検討した結果、9-cis retinoic acid添加によって白色脂肪細胞への分化が抑えられた。これらの結果から、現段階では条件②が褐色脂肪細胞へ最も効率よく分化していることが示唆された。

(2) 分化誘導前後において発現変動する分子群

脂肪細胞分化前後(誘導14日目)における細胞から全mRNAを回収し、RT-PCR法で種々の遺伝子群の発現を検討した。

Galectin-12、Leptin、adiponectinの白色脂肪細胞分化マーカーは、未分化および褐色脂肪細胞へ分化させた細胞ではほとんど発現していないが、白色脂肪分化後では非常に高い発現を確認できた。PPAR γ とLPLは、白色脂肪細胞だけでなく褐色脂肪細胞でも発現を確認した。これらの遺伝子発現解析と先述したOil red染色の結果より白色脂肪細胞への分化が抑制されていることが示唆された。近年、BMP7による褐色脂肪細胞の分化誘導においてミトコンドリア数が増えているという報告がある。白色脂肪細胞から褐色脂肪細胞様の細胞を生産することで、ミトコンドリア代謝機構を調整してメタボリックシンドロームの治療法あるいは糖尿病の症状の軽減などへの応用できることが期待される。

(3) 脂肪幹細胞/脂肪細胞の機能解析

SecinH3 が脂肪前駆細胞の遊走を抑制するかどうかを検討した。その結果、有意な抑制効果が観察され、これまで報告されている上皮細胞や線維芽細胞だけではなく脂肪前駆細胞の遊走においても Cytohesin ファミリー分子が

働いていることが示唆された。近年、細胞遊走において中心的な役割を果たしているアクチン重合のシグナルが間葉系幹細胞の分化機構と密接に関与していることが報告されていることから、脂肪前駆細胞の Cytohesin を含む遊走機構を明らかにし、幹細胞から脂肪細胞への分化機構との関連性を検討することを目的とした。始めにマウス 3T3-L1 細胞に発現する Cytohesin ファミリーを RT-PCR 法で確認し、主に発現していた Cytohesin-2、-3 およびその基質である Arf1/6 の siRNA を用いて、細胞遊走に与える効果を検討した。これら種々の siRNA を組み合わせた実験結果により Cytohesin-2/Arf6 経路が関与することが示唆され、さらに創傷によって遊走を誘引させると Arf6 が活性されていた。次に、遊走時における Cytohesin-2 の局在を検討するために細胞接着斑のマーカーである Paxillin および vinculin あるいは F-actin と共染色し定量化した結果、Paxillin と細胞膜に 64.4% \pm 3.9%、細胞接着斑に 13.3% \pm 1.4%の共局在を観察した。以上の共免疫染色の結果やこれまで当研究部で行われた結果などから Cytohesin-2 と Paxillin が相互作用する可能性が高いことが考えられたため、これら蛋白質の相互作用を共免疫沈降法により検討した。3T3-L1 細胞の内在性での結合および 293T 細胞における過剰発現の系においても両蛋白質の結合を検出することができ、さらに詳細にドメイン間の相互作用を検討した結果、in vivo あるいは in vitro において Cytohesin-2 の pleckstrin homology (PH) ドメインと C 末端領域の塩基性アミノ酸に富む領域(以下 PH+b ドメイン)と

Paxillin の LIM2 ドメインと相互作用することが明らかになった。一方、Paxillin の siRNA 処理によるノックダウン効果で、細胞遊走の抑制および Cytohesin-2 の局在が変化し Arf6 に対する GEF 活性も低下したことから、細胞遊走時における Cytohesin-2 の局在は Paxillin により制御されていることが明らかとなった。さらにこれらの分子間相互作用の結論から、これらの Paxillin の LIM2 ドメインおよび Cytohesin-2 の PH+b ドメインを過剰発現させると活性化 Arf6 量を低下させるドミナントネガティブとして働き、脂肪前駆細胞の遊走を抑制するかを検討した結果、著しい抑制効果が観察された。これらの分子間相互作用が細胞遊走の制御に重要な働きをすることが示唆された。以上の結果より Paxillin は Cytohesin-2 に対して細胞接着斑/細胞膜でプラットフォームとして働き、酵素活性および細胞内局在に寄与していることが示唆された。

(4) 脂肪細胞への分化誘導及び脂肪由来幹細胞及び幹細胞から分化する細胞における培養系を用いた薬物毒性評価系の確立・薬物の評価

本研究では、レチノイン酸添加による褐色脂肪細胞の分化誘導機構について検討した。

始めに、褐色脂肪細胞への分化過程において発現変動する遺伝子の同定を試みた結果、当研究部門で研究対象としている蛋白質である Arf (ADP-ribosylation factor) のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) であり、細胞遊走を司るシグナル伝達に関与する Cytohesin ファミリー (特に Cytohesin-2/ARNO) の発現上昇が認められ

た。一方、これまで当研究部で行われた結果やバイオインフォマティクスを用いた蛋白質構造予測などから Cytohesin-2 と α -アクチニンファミリーが相互作用する可能性が高いことが考えられた。アクチニンは、アクチン結合蛋白質であり細胞の形態変化を調節することが主な機能として一般的に知られているが、近年細胞内質での局在の他に核移行や転写因子と相互白湯することも明らかにされており、細胞の分化などへの関与も示唆されている。そこで、脂肪幹細胞から白色および褐色脂肪細胞における actinin-1 の発現変化を検討したが、いずれも有意な変化は見られなかった。

次に蛋白質の相互作用によってその機能する可能性を考え共免疫沈降法により両蛋白質が結合するか否かを検討した。結果、293T 細胞における過剰発現の系において両蛋白質の結合を検出することができた。

これらの結果より、Cytohesin-2 と actinin-1 は、互いに相互作用して活性化あるいは不活性化し細胞内シグナルを調節していることが示唆された。今後は、内在性の Cytohesin-2 および actinin-1 が、レチノイン酸誘導による分化過程において常に結合しているのかあるいは分化誘導によってはじめて結合するのかが検討する予定である。さらに、actinin ファミリーは、細胞分化時においてレチノイン酸添加によってレチノイル化されることがありその翻訳後修飾が分化に重要な役割をはたしていることが報告されているために我々の実験系においてもこの修飾が必要であるかなども検討する。

一方、Cytohesin-2 と actinin-1 の細胞内局在を検討するために、各々蛍光蛋白質 (GFP, RFP) を

付加させたプラスミドを脂肪幹細胞にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入後に観察した結果、両蛋白質とも細胞膜あるいは細胞接着斑に局在した。またその局在は細胞遊走時に顕著に見られたことから、これら蛋白質は主に細胞極性に深く関与することが示唆された。

D. 考察

脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の開発については、同じ素材を用いて、2次元と3次元などの立体構造が違う基材を作製、その構造の違いが細胞の増殖、分化に影響を与えることを調べた研究は、これまでには、ほとんど報告されていない。今回の研究から、基材の立体構造が細胞の増殖と分化に影響を与え、細胞増殖が、2次元基材に比べて、3次元基材の方がよいことがわかった。さらに、このことが、成体幹細胞を用いて確認された例はほとんどない。これまでに、私たちは通常のline化された細胞や正常細胞に対しても、同じような検討を行っている。これらの結果と今回の結果を比べると、基材の立体構造が細胞の接着と増殖に与える影響に関しては、幹細胞も通常の正常細胞と同様の挙動をとることがわかった。細胞の挙動は、細胞の栄養液と接着基材との両方から影響をうけることが予想される。今回の結果でも、骨分化、脂肪分化挙動が基材の立体構造により影響されることが示された。加えて、基板表面を細胞接着性をもつタンパク質で修飾することによって、細胞の接着と増殖が高まることがわかった。さらに、このタンパク質修飾による促進効果は2次元や3次元などの基材の立体構造

に関係なく、同じであることも確認できた。通常、細胞の増殖と分化は、細胞の表面レセプターにリガントが結合、その刺激が細胞内に伝わり、細胞内シグナルが動くことで開始されるといわれている。そこで、まず、その初期ステップであるリガントタンパク質の基材表面への吸着挙動について調べた。フィブロネクチン、ビトロネクチンなどの吸着を評価したところ、予想に反して、基材による吸着量の違いは認められなかった。吸着量が同じであっても、吸着したリガンドタンパク分子の変性度合いが違えば、細胞表面レセプターとの相互作用と、それに引き続く細胞内シグナル伝導パターンの違いがもたらされるであろう。その結果として、分化挙動の違いが現われたと考えられる。

吸引脂肪から分離した接着細胞中には、多分化能を有する幹細胞が含まれている。それらの細胞は繊維芽細胞様の形態で強い増殖能があり、比較的長期間継代することが可能である。PLAは脂肪組織の結合組織間に存在している細胞で酵素処理により分離される。一方のLAFは吸引脂肪においては液体中に遊離している細胞である。両者は細胞群としては含まれる細胞の由来に違いが認められるが、幹細胞としての明確な違いは認められない。共に間葉系細胞への分化能を示し、表面マーカーの変化も同等である。

組織から分離したばかりの細胞は、幹細胞以外にも血液由来細胞や血管由来細胞を含んでいる。今回の解析から、分離直後の細胞数はPLAの方がLAFよりも2倍から8倍多いが、含まれる脂肪由来幹細胞の割合はおおよそ同

等であることがわかった。

上記の細胞数や脂肪由来幹細胞の割合、増殖培養時の成長曲線は個人によって大きな差が認められた。今後、薬剤評価に用いる細胞を選別する場合、そのような個人差の標準化が課題と思われた。

アルカンチオール SAM 技術により簡単に基材表面の化学修飾することができた。さらに、2種類のアカンチオールの仕込み量を変えて反応することで、基材表面の化学組成を変化させることも可能であった。表面分析により、化学組成が変化できることも確認でき、アルカンチオール SAM 技術が材料設計方法として優れていることがわかった。基材表面の物理化学的性質が、細胞の接着と増殖に影響を与えることはこれまでも報告されている。しかしながら、成体幹細胞を用いて研究された例はほとんどない。今回の結果から、基材表面の物理化学的性質の細胞の接着と増殖に与える影響に関して、幹細胞も通常の正常細胞と同様の挙動をとることがわかった。細胞の挙動は、細胞の栄養液と細胞の基材との両方から影響をうけることが予想される。今回の結果でも、骨分化、脂肪分化挙動が基材の性質により影響されることが示された。通常、細胞の増殖と分化は、細胞の表面レセプターにリガントが結合、その刺激が細胞内に伝わり、細胞内シグナルが動くことで開始されるといわれている。そこで、まず、その初期ステップであるリガントタンパク質の基材表面への吸着挙動について調べた。フィブロネクチン、ビトロネクチンなどの吸着を評価したところ、予想に反して、基材による吸着量の

違いは認められなかった。吸着量が同じであっても、吸着したリガンドタンパク分子の変性度合いが違えば、細胞表面レセプターとの相互作用と、それに引き続く細胞内シグナル伝導パターンの違いがもたらされるであろう。その結果として、分化挙動の違いが現われたと考えられる。

ヒト脂肪由来幹細胞を用いて、分化の過程における遺伝子の発現を解析し多くの遺伝子の量的変化を観察することが出来た。また、4種類の薬物の脂肪蓄積に対する影響を見ることにより、4種類全ての薬剤が濃度依存的に脂肪蓄積を阻害することが明らかになった。今後、それらの薬剤の遺伝子発現に対する影響を調べることにより、その薬剤の脂肪細胞分化に対する作用を評価する必要がある。今回、われわれはヒト細胞を用いることにより、ヒト特異的かつ感受性の高い試験を行なうことが出来た。この方法をさらに進めて行くことにより、種差の問題を克服し、動物実験を補完する薬物毒性試験の新たな代替法となることが期待される。

脂肪幹細胞/脂肪細胞の機能解析については、本研究結果から、Cytohesin-2はArf6を介して脂肪幹細胞/脂肪前駆細胞の細胞遊走を制御することが明らかとなり、さらに細胞接着因子である Paxillin との相互作用によりその細胞内局在および活性が調節されていることが明らかとなった。このことから Cytohesin-2/Arf6 シグナル伝達経路を介する細胞内極性の消失が間葉系幹細胞である脂肪幹細胞を分化の方向へと向かわせることが示唆された。

脂肪細胞への分化誘導及び脂肪由来幹細胞及び幹細胞から分化する細胞における培養系を用いた薬物毒性評価系の確立・薬物の評価に関しては、脂肪幹細胞からレチノイン酸誘導による褐色脂肪細胞への分化・増殖機構の一部が Cytohesin-2 を介していることが示唆された。本研究により今後この系を用いた薬物のスクリーニングのアウトプット因子として利用できる可能性がある。

E. 結論

PET 素材からなる 2 次元と 3 次元の細胞培養基材を調製、それらに対するヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖、および骨分化、脂肪分化について調べた。その結果、2 次元に比べて、3 次元基材における細胞接着、増殖が高まっていることがわかった。しかしながら、分化に関しては、期待していたほどに立体構造の影響は小さく、基材による違いはほとんど見られなかった。細胞接着性タンパク質による基材表面の修飾による細胞接着促進も 2 次元と 3 次元基材の間では大きな違いは認められなかった。表面性質が細胞の増殖と分化に与える影響について、細胞内シグナルレベルでの解析を加え、細胞挙動の違いについて解析を行う予定である。また、分化に影響すると考えられる生物由来リガント、例えば、細胞接着シグナルペプチドなどを用いて、その基材表面への固定化密度などが細胞の増殖や分化に与える効果について調べていく。脂肪由来幹細胞はその増殖能と多分化能から、薬剤評価に用いることができる有効な細胞であることが明らかとなった。今後、安定した

評価系を構築するため、目的に合わせて培養期間や細胞を最適化する必要がある。同時にそれらの条件が個人差によってどの程度影響を受けるかを慎重に検討しなければならない。アルカンチオール SAM 技術を用いることで表面の物理化学的性質の異なる基材を作製できた。基材表面の性質がヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖、および骨分化、脂肪分化に影響を与えることがわかった。今後は、神経細胞への分化についても検討を加えていく。また、表面性質が細胞の増殖と分化に与える影響について、細胞内シグナルレベルでの解析を加え、細胞挙動の違いについて解析を行う予定である。また、分化に影響すると考えられる生物由来リガント、例えば、細胞接着シグナルペプチドなどを用いて、その基材表面への固定化密度などが細胞増殖、分化に与える効果について調べていく。

脂肪幹細胞から褐色脂肪細胞への分化・増殖機構が明らかになったことにより今後この系を用いた薬物のスクリーニングが可能となる。

ヒト脂肪幹細胞から成熟脂肪細胞への分化過程において、発現上昇する Cytohesin-2 はその上流分子に Paxillin、その下流分子に Arf6 さらにはアクチン重合などのシグナル伝達経路を介して細胞遊走を制御することが本研究により明らかにすることができた。前年度の成果である「SecinH3 添加は、脂肪細胞への分化を促進させる。」との結果と組み合わせると、これまで報告されてきた間葉系幹細胞の運動性を阻害すると分化速度および分化効率が上昇するという結果を支持する結果である。また今回我々が見出した新たなシグナル伝達

経路は、これまで報告されてきた分子の上流に位置することが推察されることから、分化誘導のインプットシグナルを受ける受容体あるいは膜貫通型蛋白質の同定へ一歩近づいたのではないかと考えている。一方、我々は幹細胞だけではなくあらゆる細胞の形態を維持する張力を制御するアクチン重合を調節する最も重要な因子の一つである分子と Cytohesin-2 とを直接的に関連付けられる新たな実験結果が得られており、Cytohesin-2 が分化においてより中心的な役割を果たしている可能性がある。我々の仮説である「Cytohesin を活性化する因子やそれを制御するメカニズムを明らかにすることによって、肥満の抑制さらには過剰な脂肪組織の構築を抑制できる」つまり Cytohesin-2 を活性化状態にすることで脂肪組織内に存在する脂肪幹細胞/前駆細胞を未分化な状態に保つことができると考え、Cytohesin-2 を活性化させるメタボリックシンドローム薬剤あるいは食品開発に提唱を促す。今後は、Cytohesin-2 活性化因子の探索やこの分子機構が脂肪幹細胞だけではなく iPS 細胞や F9 テラトーマ細胞など他の未分化な細胞などにも関与するかなどを検討する必要がある。このような新規薬剤を用いた薬物毒性試験にヒト組織由来幹細胞を用いることはこれまで様々なシグナル機構を見出す一つの有用な手段に成り得ることが期待される。

レチノイン酸誘導における脂肪幹細胞から褐色脂肪細胞の分化過程において、発現上昇する Cytohesin はアクチン結合蛋白質である actinin-1 と結合することが本研究において

明らかになり、前年度の成果である「効率的な褐色脂肪細胞への分化条件の検討」との結果と組み合わせると、レチノイン酸誘導による分化機構において新たなシグナル伝達経路を同定することができた。また、Cytohesin-2 と actinin-1 は、actinin-1 が持つカルシウム結合モチーフによりカルシウム濃度依存的に相互作用した。レチノイン酸投与により一時的にカルシウム濃度が増加することが知られていることから、この分子機構はレチノイン酸によって Cytohesin の発現上昇とセカンドメッセンジャーであるカルシウム濃度変化によって actinin-1 と結合しアクチンなどの細胞骨格調節機構に働き、幹細胞から褐色脂肪細胞へ分化促進させることが推察できる。一方、両蛋白質は各々4種のアイソフォームが存在し、その相同性も比較的高い。従って、本研究で用いた以外の分子同士が相互作用する可能性が極めて高い。特に actinin-4 は、アクチンと共に核内に進入し転写因子と相互作用することで転写調節し分化に深く関与していることが報告されていることから、他の分子同士の相互作用についても検討し、脂肪幹細胞の分化に限らず、レチノイン酸誘導を受ける他の細胞の分化機構にも応用できると考えている。今後さらに褐色脂肪細胞への分化効率を上げる実験系を確立し、脂肪幹細胞から褐色脂肪細胞の分化に影響を及ぼす薬物毒性評価試験の改良を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

村部麻由、山内淳司、藤原葉子、三部篤、田

- 上昭人. マウス胚性幹細胞分化誘導系を用いたバルプロ酸による発生毒性解析 日本小児臨床薬理学会雑誌 印刷中 (2007)
- 山内淳司、宮本 幸、藤原葉子、三部 篤、村部麻由、田上昭人. バルプロ酸による新規誘導遺伝子 Gadd45a による神経分化作用の解析 日本小児臨床薬理学会雑誌 (2007)
- Koshimizu TA, Tanoue A, Tsujimoto G. Clinical implications from studies of alpha adrenergic receptor knockout mice. *Biochem Pharmacol.* 2007;73(8):1107-1112.
- Hiroshima M, Aoyagi T, Fujiwara Y, Birumachi J, Shigematsu Y, Kiwaki K, Tasaki R, Endo F, Tanoue A. Hypermetabolism of fat in V1a vasopressin receptor knockout mice. *Mol Endocrinol.* 2007; 21:247-258.
- Murabe M, Yamauchi Y, Fujiwara F, Hiroshima M, Sanbe A, Tanoue A. A novel embryotoxic estimation method of VPA using ES cells differentiation system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 352:164-169.
- Sanbe A, Yamauchi J, Miyamoto Y, Kitagawa Y, Murabe M, Tanoue A. Interruption of CryAB-amyloid oligomer formation by HSP22. *J Biol Chem.* 2007; 282: 555-563.
- Fujiwara Y, Hiroshima M, Sanbe A, Yamauchi J, Tsujimoto G, Tanoue A. Mutual regulation of vasopressin- and oxytocin-induced glucagon secretion in V1b vasopressin receptor knockout mice. *J Endocrinol.* 2007; 192(2): 361-369.
- Miyamoto Y, Yamauchi J, Sanbe A, Tanoue A. Dock6, a Dock-C subfamily guanine-nucleotide exchanger, has dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. *Exp Cell Res.* 2007; 313(4): 791-804.
- Oikawa R, Nasa Y, Ishii R, Kuwaki T, Tanoue A, Tsujimoto G, Takeo S. Vasopressin V1A receptor enhances baroreflex via the central component of the reflex arc. *Eur J Pharmacol.* 2007; 558(1-3): 144-150.
- Hiroshima M, Wang S, Aoyagi T, Oikawa R, Sanbe A, Takeo S, Tanoue A. Vasopressin promotes cardiomyocyte hypertrophy via the vasopressin V1A receptor in neonatal mice. *Eur J Pharmacol.* 2007; 559(2-3): 89-97.
- Egashira N, Tanoue A, Matsuda T, Koushi E, Harada S, Takano Y, Tsujimoto G, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. Impaired social interaction and reduced anxiety-related behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Behav Brain Res.* 2007; 178(1): 123-127.
- Murabe M, Yamauchi J, Fujiwara Y, Miyamoto Y, Hiroshima M, Sanbe A, Tanoue A. Estimation of the embryotoxic effect of CBZ using an ES cell differentiation system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 356:739-744.
- Faber J, Szymeczek C, Cotecchia S, Thomas S, Tanoue A, Tsujimoto G, Zhang H. Alpha 1-Adrenoceptor-Dependent Vascular Hypertrophy and Remodeling in Murine Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292(5):

H2316-23.

Aoyagi T, Birumachi J, Hiroyama M, Fujiwara Y, Sanbe A, Yamauchi J, Tanoue A. Alteration of glucose homeostasis in V1a vasopressin receptor-deficient mice. *Endocrinology*. 2007;148: 2075-2084.

Yamauchi J, Miyamoto Y, Murabe M, Fujiwara Y, Sanbe A, Fujita Y, Murase S, Tanoue A. Gadd45a, the gene induced by the mood stabilizer valproic acid, regulates neurite outgrowth through JNK and the substrate Paxillin in N1E-115 neuroblastoma cells. *Exp Cell Res*. 2007; 313: 1886-1896.

Hiroyama H, Aoyagi T, Fujiwara Y, Oshikawa S, Sanbe A, Endo F, Tanoue A. Hyperammonemia in V1a vasopressin receptor knockout mice caused by the promoted proteolysis and reduced intrahepatic blood volume. *J Physiol*. 2007; 581:1183-92.

Hosoda C, Hiroyama M, Sanbe A, Birumachi J, Kitamura T, Cotecchia S, Simpson PC, Tsujimoto G, Tanoue A. Blockade of both α 1A- and α 1B-adrenergic receptor-subtype signaling is required to inhibit neointimal formation in the mouse femoral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: H514-9.

Birumachi JI, Hiroyama M, Fujiwara Y, Aoyagi T, Sanbe A, Tanoue A. Impaired arginine-vasopressin-induced aldosterone release from adrenal gland cells in mice lacking the vasopressin V1A receptor. *Eur*

J Pharmacol. 2007; 566: 226-230.

Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura H, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Alpha-1 adrenoceptor is required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol*. 2007; 152: 332-340.

Daikoku R, Kunitake T, Kato K, Tanoue A, Tsujimoto G, Kannan H. Body water balance and body temperature in vasopressin V(1b) receptor knockout mice. *Auton Neurosci*. 2007; 136: 58-62.

Fujiwara Y, Hiroyama H, Sanbe A, Aoyagi T, Birumachi J, Tsujimoto G, Tanoue A. Insulin hypersensitivity in mice lacking the V1b vasopressin receptor. *J Physiol*. 2007; 584: 235-244.

Miyamoto Y, Yamauchi J, Chan JR, Okada A, Tomooka Y, Hisanaga SI, Tanoue A. Cyclin-dependent kinase 5 regulates differentiation of oligodendrocyte precursor cells through the direct phosphorylation of paxillin. *J Cell Sci*. 2007; 120(Pt 24): 4355-66.

Tsunematsu T, Fu LY, Yamanaka A, Ichiki K, Tanoue A, Sakurai T, van den Pol A. Vasopressin increases locomotion through a V1a receptor in the orexin/hypocretin neurons- implication for water homeostasis. *J Neurosci*. 2008; 28(1): 228-38.

Egami T, Egami K, Tanoue A. Study of antibody titers after measles vaccination: Fever within seven days of vaccination and efficacy of booster doses. *Archives of*

Disease in Childhood.

Yamauchi J, Miyamoto Y, Chan JR, Tanoue A. Phosphorylation of the exchange factor Dock7 by the neuregulin receptor ErbB2 regulates Schwann cell migration. *J Cell Biol.*

Sanbe A, Takagi N, Fujiwara Y, Yamauchi J, Endo T, Mizutani R, Takeo S, Tsujimoto G, Tanoue A. Alcohol preference in mice lacking the Avpr1a vasopressin receptor. *American Journal of Physiology.*

Hiroshima M, Fujiwara Y, Nakamura K, Aoyagi T, Mizutani R, Sanbe A, Tasaki R, Tanoue A. Altered lipid metabolism in vasopressin V1B receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol.* 2009; 602: 455-461.

Imai K, Kusakawa S, Tanoue A, Kuwagata M, Senuma M, Furuya M, Takashima M. An Attempt to Cell Recovery Factor in the Cell Differentiation Culture with the Embryonic Stem Cell Test (EST). *Journal of Oral Tissue Engineering.* 2009; 6 (3): 152-158.

Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Miyauchi N, Mizutani R, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Enhanced Vascular Contractility in Alpha1-Adrenergic Receptor-Deficient Mice. *Life Sci.* 2009 May 22; 84(21-22): 713-8.

Yamauchi J, Miyamoto Y, Torii T, Mizutani R, Nakamura K, Sanbe A, Koide H, Kusakawa S, Tanoue A. Valproic acid-inducible Arl4D and cytohesin-2/ARNO, acting through the downstream Arf6, regulate neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Exp Cell Res.* 2009 Jul 15; 315(12): 2043-52.

Sanbe A, Daicho T, Mizutani R, Endo T, Miyauchi N, Yamauchi J, Tanonaka K, Glabe C, Tanoue A. Protective effect of geranylgeranylacetone via enhancement of HSPB8 induction in desmin-related cardiomyopathy. *PLoS One.* 2009; 4(4): e5351

Nakamura K, Aoyagi T, Hiroshima M, Kusakawa S, Mizutani R, Sanbe A, Yamauchi J, Kamohara M, Momose K, Tanoue A. Both V1A and V1B vasopressin receptors deficiency result in impaired glucose tolerance. *Eur J Pharmacol.* 2009 Jun 24; 613(1-3): 182-8.

Mizutani R, Yamauchi J, Kusakawa S, Nakamura K, Sanbe A, Torii T, Miyamoto Y, Tanoue A. Sorting nexin 3, a protein upregulated by lithium, contains a novel phosphatidylinositol-binding sequence and mediates neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Cellular Signalling.* 2009 Nov; 21(11): 1586-94.

Aoyagi T, Kusakawa S, Sanbe A, Hiroshima M, Fujiwara Y, Yamauchi J, Tanoue A. Enhanced effect of neuropeptide Y on food intake caused by blockade of the V1A vasopressin receptor. *Eur J Pharmacol.* 2009 Nov 10; 622(1-3): 32-6.

Sanbe A, Mizutani R, Miyauchi N, Yamauchi J, Nagase T, Yamamura KI, Tanoue A. Inhibitory Effects of Cigarette Smoke Extract on Neural Crest Migration occur through suppression of R-spondin1 expression via Aryl Hydrocarbon Receptor. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch*

Pharmacol. 2009 Dec;380(6):569-76. Epub 2009 Sep 19.

Imai K, Suese K, Kusakawa S, Tanoue A, Kuwagata M, Senuma M, Furuya M, Takashima M. Comparison of the Cell Differentiation Level of Mouse iPS Cells and ES-D3 Cells Using the Embryonic Stem Cell Test (EST) Protocol Attempting to Develop a New in Vitro Embryotoxicity Test Method. Journal of Oral Tissue Engineering. 2009; 7(1):38-43

Wang X, Matsumoto-Miyai K, Yoshizumi M, Ito T, Yanase H, Momota Y, Tsujimoto G, Tanoue A, Nimura T, Kawatani M. Urothelial α 1D receptor is predominantly involved in the adrenergic facilitation of micturition reflex. Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS). 2009 Sep; 1: S10-S14.

Ishizuka Y, Abe H, Tanoue A, Kannan H, Ishida Y. Involvement of vasopressin V1b receptor in anti-anxiety action of SSRI and SNRI in mice. Neurosci Res. 2009 Nov 12. In press. [Epub ahead of print]

Oikawa R, Hosoda C, Nasa Y, Daicho T, Tanoue A, Tsujimoto G, Takagi N, Tanonaka K, Takeo S. Decreased Susceptibility to Salt-induced Hypertension in Subtotally Nephrectomized Mice Lacking the Vasopressin V1a Receptor. Cardiovasc Res. 2010 Jan 29. [Epub ahead of print]

Inoue S, Iida Y, Otani Y, Hirano Y, Tabata Y. Adhesion behavior of human adipo-stromal cells on self-assembled monolayers with different surface densities or gradients RGD

peptide. Journal of Biomaterials Science, 20, 495-510(2009)

Sachiko Inoue, Masaaki Imamura, Yoshiaki Hirano, and Yasuhiko Tabata. Adhesion and proliferation of human adipo-stromal cells for two- or three dimensional poly(ethylene terephthalate) substrates with or without RGD immobilization. Journal of Biomaterials Science, 20, 721-736(2009)

2. 学会発表

1) 国際学会

Hiroyama M, Aoyagi T, Fujiwara Y, Sanbe A, Tanoue A. Hyperammonemia in V1a vasopressin receptor knockout mice caused by the promoted proteolysis and reduced intrahepatic blood volume. World congress on Neurohypophysial hormones, Sept. 18-22, Regensburg, (Germany), 2007.

Sanbe A, Takagi N, Fujiwara Y, Yamauchi J, Takeo S, Tsujimoto G, Tanoue A. Alcohol preference in mice lacking the V1a vasopressin receptor. World congress on Neurohypophysial hormones, Sept. 18-22, Regensburg, (Germany), 2007.

Sanbe A, Takagi N, Fujiwara Y, Aoyagi T, Yamauchi J, Takeo S, Tanoue A. Vasopressin V1a receptor can regulate alcohol preference in mice. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. Nov. 4-7, San Diego, California. (U.S.A.), 2007.

Yamauchi J, Miyamoto Y, Sanbe A, Kusakawa S, Tanoue A. JNK phosphorylation of paxillin,

acting through the Rac1 and Cdc42 signaling cascade, mediates neurite outgrowth. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. Nov. 4-7, San Diego, California. (U.S.A.), 2007.

Miyamoto Y, Yamauchi J, Sanbe A, Tanoue A. Dock6, a Dock-C subfamily guanine-nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. Nov. 4-7, San Diego, California. (U.S.A.), 2007.

Tanoue A. Analysis of AVP functions via V1a and V1b receptors with knockout mice. Japan - Mexico Work-Shop. Feb. 25-27, 2009, Mexico City, Mexico.

Miyamoto Y, Torii T, Tanoue A, Yamauchi J. Control of oligodendrocyte migration and differentiation through the novel phosphorylation mechanism. Ninth Biennial Satellite Meeting of the ISN on Myelin Biology. Aug. 19-23, Gyeongju, S. Korea, 2009. (国際神経化学会大会 髄鞘部会、慶州、韓国)

Yamauchi J, Miyamoto Y, Sanbe A, Torii T, Tanoue A. The key role of Dock7 exchange factor in NRG1-induced Schwann cell migration. Ninth Biennial Satellite Meeting of the ISN on Myelin Biology. Aug. 19-23, Gyeongju, S. Korea, 2009. (国際神経化学会大会 髄鞘部会、慶州、韓国)

Nakamura K, Aoyagi T, Hiroyama M, Kusakawa S, Sanbe A, Yamauchi J, Tanoue A. Deficiency of vasopressin V1A and V1B receptors results in

impaired glucose tolerance. WCNH 2009 第8回国際下垂体後葉ホルモン会議、9月4日～8日、2009、小倉(北九州国際会議場)

Torii T, Miyamoto Y, Sanbe A, Tanoue A, Yamauchi J. Cytohesin-2/ARNO, through its interaction with paxillin, regulates preadipocyte migration. International Symposium on Cell Signaling ~Principles and functions~. 11月18日～19日、2009、つくば(筑波大学総合研究棟D)

Sanbe A, Miyuchi N, Yamauchi J, Tanoue A. Impairment of tubulin deacetylation can enhance heart disease in desmin-related cardiomyopathy. The 26th Annual Meeting of ISHR Japanese Section (第26回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会), 12月4日～5日、2009、札幌(北海道大学 学術交流会館)

2) 国内学会

藤原葉子、三部篤、田中芳夫、山内淳司、小池勝夫、辻本豪三、田上昭人 アルファー1A-、1B-および1D-アドレナリン受容体トリプルノックアウトマウスの血管収縮反応 第80回日本薬理学会年会、3月14日～16日、2007、名古屋

青柳利紀、田上昭人 Alteration of glucose homeostasis in V1a vasopressin receptor-deficient mice. 第80回日本薬理学会年会、3月14日～16日、2007、名古屋

宮本幸、山内淳司、三部篤、田上昭人 TrkB binds and tyrosine-phosphorylates Tiam1 leading to activation induction of neurite outgrowth. 第80回日本薬理学会年会、3月14日～16日、2007、名古屋

三部篤、田中芳夫、藤原葉子、山内淳司、小池勝夫、辻本豪三、田上昭人 Alteration of male sexual function in alpha1A-, 1B- and 1D-adrenergic receptor triple knockout mouse. 第80回日本薬理学会年会、3月14日～16日、2007、名古屋

廣山眞巳、青柳利紀、藤原葉子、美留町潤一、Yosuke Shigematsu, Kohji Kiwaki, Ryuji Tasaki, 遠藤文夫、田上昭人 Hypermetabolism of fat in V1a vasopressin receptor knockout mice. 第80回日本薬理学会年会、3月14日～16日、2007、名古屋

田上昭人 (講演) ES細胞等による薬剤毒性試験法の開発 ヒューマンサイエンス基礎研究講習会 6月13日東京

三部篤、田中芳夫、藤原葉子、山内淳司、小池勝夫、辻本豪三、田上昭人 $\alpha 1$ アドレナリン受容体欠損マウスの雄性生殖機能 第49回日本平滑筋学会総会、7月4日～6日、2007、奈良(橿原市)

山内淳司、宮本幸、三部篤、Eric M. Shooter、田上昭人 神経栄養因子-3によるシュワン細胞の遊走はRas - Tiam 1 - Rac 1経路を必要とする

第30回日本神経科学大会、9月10日～12日、2007、横浜

宮本幸、山内淳司、三部篤、William C. Mobley、田上昭人 BDNFによるcortical ニューロンの突起伸張はTiam1のチロシンリン酸化を必要とする 第30回日本神経科学大会、9月10日～12日、2007、横浜

藤田裕子、廣山眞巳、三部篤、田上昭人 神経幹細胞を用いたアルコールの中樞神経系初期形成

に及ぼす毒性評価 第34回日本小児臨床薬理学会、11月16日～17日、2007、熊本

宮本幸、草川森士、三部篤、山内淳司、田上昭人 パルプロ酸による神経分化作用に關与する新規誘導遺伝子NF2の同定 第34回日本小児臨床薬理学会、11月16日～17日、2007、熊本

草川森士、田上昭人 マウスES細胞を用いたSSRIの安全性評価試験の確立とその応用 第34回日本小児臨床薬理学会、11月16日～17日、2007、熊本

水谷玲子、三部篤、田上昭人 タバコ主流煙抽出物はAryl hydrocarbon receptorを介して神経堤細胞遊走を抑制する 第34回日本小児臨床薬理学会、11月16日～17日、2007、熊本

山内淳司、宮本幸、三部篤、草川森士、田上昭人 新規交換因子 Dock6による神経突起誘導：その下流シグナル伝達経路 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、12月11日～15日、2007、横浜

宮本幸、草川森士、山内淳司、田上昭人 新規交換因子 Dock6による神経突起誘導 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、12月11日～15日、2007、横浜

草川森士、宮本幸、藤原葉子、三部篤、小出寛、山内淳司、田上昭人 マウスES細胞を用いたSSRIの安全性評価試験の確立とその応用 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、12月11日～15日、2007、横浜
鳥居知宏、宮本幸、三部篤、山内淳司、田上昭人、前駆脂肪細胞におけるCytohesin-2とArf6/Arf1経路による細胞遊走制御 第31回日本分子生物学会年会・第81期日本生化学会大会 合同学会、12月9日～12日、2008、神戸